

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ВЛИЯЮТ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Федорова Н.Д.^{1,2}, Сумбатян Д.А.¹, Стукова М.А.³, Иванов А.В.⁴, Семенова Е.В.¹,
Филатов М.В.¹, Варфоломеева Е.Ю.^{1,2}

¹НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ

мкр. Орлова роща, 1, г. Гатчина, 188300, РФ

²НИЦ «Курчатовский институт»

пл. Академика Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ

³ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»

ул. Проф. Попова, г. Санкт-Петербург, 197376, РФ

⁴Клиника высоких медицинских технологий СПбГУ им. Н.И. Пирогова

наб. р. Фонтанки, 154, г. Санкт-Петербург, 198103, РФ

Поступила в редакцию: 05.07.2021

Аннотация. Нейтрофилы – основные клетки врожденного иммунитета. Уничтожение патогенных микроорганизмов осуществляется нейтрофилами посредством фагоцитоза и последующей реализации механизмов генерации активных форм кислорода. Цель настоящей работы - изучение влияния вирусных инфекций на функциональную активность (интенсивность реакции респираторного взрыва) нейтрофилов периферической крови. Исследование проводилось на цельной крови человека методом проточной цитометрии. Проанализированы изменения интенсивности реакции респираторного взрыва при развитии ОРВИ и при бактериальных осложнениях. Определен компонент плазмы крови, предположительно праймирующий нейтрофилы при вирусных инфекциях (белок острой фазы фибриноген). Показано, что нейтрофилы здоровых доноров по-разному реагируют на вакцинацию инактивированными и “живыми” вакцинами против гриппа. Выявлена корреляция между способностью нейтрофилов генерировать активные формы кислорода и титром антител IgA и IgG к SARS-CoV-2 у пациентов с бессимптомным или легким Covid-19. Полученные данные подтверждают влияние вирусных инфекций на функциональную активность нейтрофилов. Кроме того, предложен белок, который может быть ответственным за это влияние.

Ключевые слова: нейтрофилы, окислительный стресс, респираторные вирусные инфекции, проточная цитометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы – крайне важные клетки врожденного иммунитета, представляя собой его первую линию защиты. Они уничтожают различные патогены, захватывая их фагоцитозом и используя реакцию респираторного взрыва (РРВ) для выработки активных форм кислорода (АФК), разрушающих захваченный патоген [1-3].

В течение длительного времени преобладало упрощенное представление о роли нейтрофилов в функционировании врожденного иммунитета [4,5]. Было четко установлено, что нейтрофилы – чрезвычайно важные участники ответа врожденного иммунитета на бактериальные и грибковые патогены, но их роль в противовирусной активности и формировании адаптивного иммунитета оставалась недооцененной [6-8]. Тем не менее, в 2013 году была опубликована работа, описывающая нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETы), образование которых инициируется вирусом гриппа человека 1-го типа [9]. Кроме того, было подтверждено, что вирусы способствуют образованию новых сетей и стимулируют NETоз нейтрофилов [10-12].

Ряд вирусных инфекций, включая вирусы гриппа и коронавирусную инфекцию, вызывают окислительный стресс [13-16]. Перепроизводство АФК и нарушение антиоксидантных механизмов может иметь решающее значение для репликации вируса и последующего заболевания, вызванного вирусной инфекцией [17].

Предполагается, что окислительный стресс играет ключевую роль в тяжелом повреждении легких, вызванном респираторными вирусами [18]. Судя по всему, супероксидные радикалы, генерируемые нейтрофилами в крови при острой вирусной инфекции, вызывают каскад воспалительных реакций. Эти реакции приводят к разрушению окружающих тканей и ускоряют развитие микротромбоза [19,20].

Множество факторов, используемых нейтрофилами для прямого уничтожения патогена, оказывают регуляторное влияние и на другие иммунные клетки [8]. Оно может осуществляться как в виде прямого межклеточного контакта, так и посредством продукции цитокинов и других биологически активных медиаторов [21,22]. Одним из важнейших механизмов воздействия нейтрофилов на клетки иммунитета является генерация АФК [23,24]. Расширение знаний о противовирусной активности нейтрофилов - чрезвычайно важная задача. Несмотря на вышеприведенные данные, до сих пор недостаточно информации об этом виде активности нейтрофилов и его механизмах.

В нашем исследовании было изучено влияние вирусных заболеваний (ОРВИ) на способность нейтрофилов к РРВ в цельной периферической крови. Также были проанализированы изменения РРВ в динамике развития вирусной инфекции. Образцы крови здоровых и больных доноров исследовали оригинальным цитометрическим

методом с применением гидроэтидина в качестве красителя [25]. Этот метод позволяет количественно оценить способность нейтрофилов генерировать АФК и имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, используемыми для изучения функциональной активности нейтрофилов. Прежде всего, это нативность условий, обеспечиваемая отсутствием необходимости выделения нейтрофилов. Во-вторых, высокая точность и воспроизводимость результатов, обусловленные способностью гидроэтидина окисляться исключительно супероксидными радикалами.

Мы предполагаем, что во время вирусной инфекции в плазме крови присутствует некоторое количество праймирующего нейтрофилов агента (или агентов), поэтому было изучено влияние компонентов плазмы крови на РРВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты.

Всего в проекте приняли участие 83 человека, проживающих в Северо-Западном регионе России. Из них 56 человек (35 мужчин и 21 женщина разных возрастных групп) были обследованы на предмет подтверждения заражения новым коронавирусом (SARS-CoV2) и других острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) в больнице Санкт-Петербургского государственного университета.

Кровь 14 человек с ОРВИ была проверена на интенсивность РРВ (8 из них - с последующим бактериальным осложнением) и 42 человек, обратившихся за подтверждением заражения новым коронавирусом (SARS-CoV2).

Исследование проводилось на цельной крови здоровых доноров и доноров с ОРВИ, а также с ОРВИ и последующими бактериальными осложнениями (обострение хронического тонзиллита, бронхита) и COVID-19. Кровь брали из вены (3-4 мл) в вакуумные гепариновые пробирки Lind-Vac (Estonia).

В контрольную группу вошли 15 здоровых людей, в анамнезе которых не было жалоб на вирусные заболевания.

В проекте также приняли участие 12 человек (две группы по 6 человек в каждой, 4 мужчины и 8 женщин разных возрастных групп), которые были вакцинированы против гриппа в "Научно-исследовательском институте гриппа имени А. А. Смородинцева" (Санкт-Петербург, Россия). Были использованы следующие вакцины: инактивированная вакцина Ultrix (Форт, Россия), живая вакцина против гриппа, адаптированная к холоду (ЖГВ) (Россия).

Этическое соглашение.

Использование биологического материала человека (крови) было одобрено Советом по биомедицинской этике больницы Санкт-Петербургского государственного университета (Россия), протокол №07/20 от 16.07.2020. Все измерения проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 года. Письменное информированное согласие было получено от всех участвующих доноров. Все клинические данные были обезличены. Все доноры дали согласие на проведение исследования.

Проточнocyтoмeтpичeская мeтoдикa рeгистpaции рeaкции рeспирaтopнoгo взpывa в нeйтpoфилax.

Реакцию респираторного взрыва (РРВ) измеряли на проточном цитометре, как в [26,27]. В контрольные образцы не добавлялся флоробовый эфир (PMA).

В экспериментах с участием фибриногена (Cloud-CloneCorp, США) его добавляли в образцы крови до концентрации 35 мкг/мл и оставляли на 30 мин при комнатной температуре перед разведением фосфатным солевым буфером (PBS).

Интенсивность флуоресценции измеряли после инкубации методом проточной цитометрии как в экспериментальных, так и в контрольных образцах крови. Для измерений использовался цитометр Cell Lab Quanta Beckman Coulter (США).

Количественным показателем интенсивности РРВ служила усредненная интенсивность флуоресценции (MFI), производимой стимулированными нейтрофилами.

Оценка концентрации С-реактивного белка с использованием иммуноферментного анализа (ИФА).

Тест ИФА для определения концентрации С-реактивного белка (СРБ) основан на принципе твердофазного непрямого иммуноферментного анализа. В тесте использовались моноклональные антитела, сорбированные в лунках стандартной микропластинки. В этом случае конъюгат фермента представляет собой козье антитело к СРБ, меченное ферментом (пероксидаза хрена). При добавлении контрольных и разбавленных тестовых сывороток в лунки SRB, присутствующий в них, одновременно связывается как с иммобилизованными антителами, так и с конъюгатом фермента, образуя "сэндвич". После 45 минут инкубации несвязанные меченые антитела удаляли промыванием. Добавляли субстрат тетраметилбензидина (ТМВ) и инкубировали 20 минут, что приводило к развитию синей окраски, прекращаемого добавлением 1N HCl, при этом цвет менялся. Интенсивность цвета прямо пропорциональна концентрации СРБ в образце и может быть измерена фотометрически при длине волны 450 нм.

Серологические тесты на антитела к SARS-CoV-2.

Забор крови проводили с помощью вакуумных пробирок с активатором свертывания крови и гелем Lind-Vac (Эстония). Сыворотку крови получали центрифугированием в течение 15 мин при 2500 об / мин.

Определение антител в крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для определения количества иммуноглобулинов IgA и IgG использовались тест-системы ELISA против SARS-CoV-2 производства Euroimmun (Германия). Измерения проводились полуколичественным методом в соответствии с инструкциями

производителя. Соотношение Ig измерялось как экстинкция образца пациента/экстинкция калибратора. Использовались термостат PST-60 HL plus (Thermo Scientific), шейкер производства АО "Вектор-бест" (Новосибирск, Россия), автоматическая мойка Hydroflex производства Тесан и считыватель Infinite F50 (Тесан, Швейцария). Измерения присутствия IgM в крови проводили качественным методом с использованием набора для тестирования ИФА SARS-CoV-2-IDM-IFA-BEST производства АО "Вектор-бест" (Новосибирск, Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистический анализ.

Эксперименты были повторены три раза ($n = 3$), и средние значения были рассчитаны как $X_m = (1/n)X_i$, где X_i является значением каждой последующей выборки. Стандартная ошибка была выражена как S^*/n , где

$$S^* = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_m)^2}{(n - 1)}}$$

и доверительный интервал был рассчитан как $X_m \pm (S^*/n^{1/2})t_{n-1, 1-\alpha/2}$, где t было найдено в таблице значений при условии, что в наших экспериментах $\alpha = 0.05$. Различия между средними значениями более чем двух групп были проанализированы с помощью ANOVA с последующим тестом Даннета. Коэффициент детерминации (R^2) нормированный от 0 до 1, использовался для оценки соответствия между наблюдаемыми и рассчитанными линейными зависимостями.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее [24] мы установили наличие стандартного распределения нейтрофилов по их способности генерировать активные формы кислорода для здоровых доноров [28,29]. Разница между средними значениями составила не более 8,4%.

В то же время заболевание, сопровождающееся тяжелыми воспалительными процессами, приводило к изменению способности нейтрофилов к РРВ в ответ на стимуляцию РМА. На цитометрической гистограмме это выглядит как смещение распределения относительно нормы. Для большинства патологий имел место сдвиг к началу координат [28].

В представленном исследовании показано повышение интенсивности РРВ в нейтрофилах периферической крови во время ОРВИ (сдвиг распределения интенсивности вправо относительно нормы). Этот факт позволяет предположить наличие праймированного состояния нейтрофилов, индуцированного вирусной инфекцией. Эффект праймированности нейтрофилов наблюдался у доноров с ОРВИ, первые симптомы которого появились примерно за два дня до взятия крови (рис. 1(3)).

На основании исследования динамики ОРВИ можно сделать вывод, что способность нейтрофилов к РРВ увеличивается в первые 48 часов заболевания, а затем возвращается к норме в случае выздоровления (рис. 2). Данные, полученные на 3-й день, не представлены, так как пик совпадает с нормальным распределением.

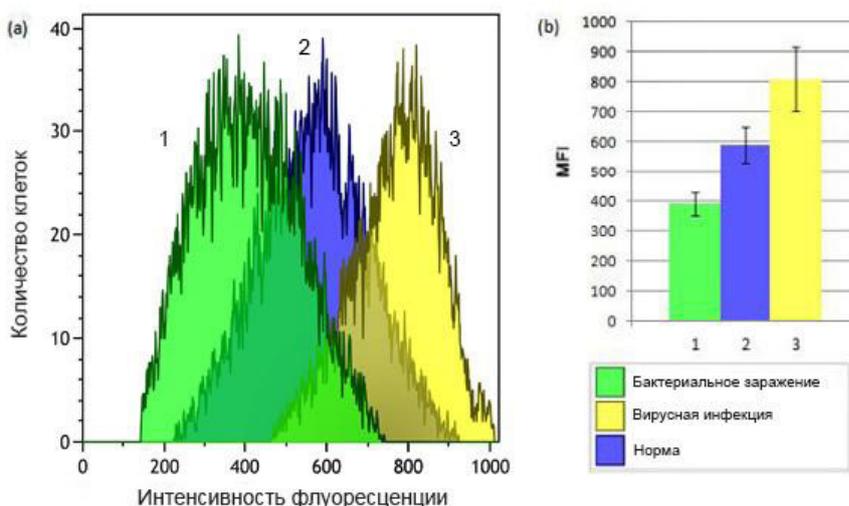


Рисунок 1 – Интенсивность реакции респираторного взрыва нейтрофилов у здоровых доноров и пациентов с вирусными и бактериальными заболеваниями

(а) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ для: 1 - пациентов с бактериальной контаминацией, 2 - здоровых доноров, 3 - пациентов с вирусными инфекциями;

(б) Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для образцов, полученных от здоровых доноров ($n=14$), пациентов с бактериальной контаминацией ($n=8$), пациентов с вирусной инфекцией ($n=6$)

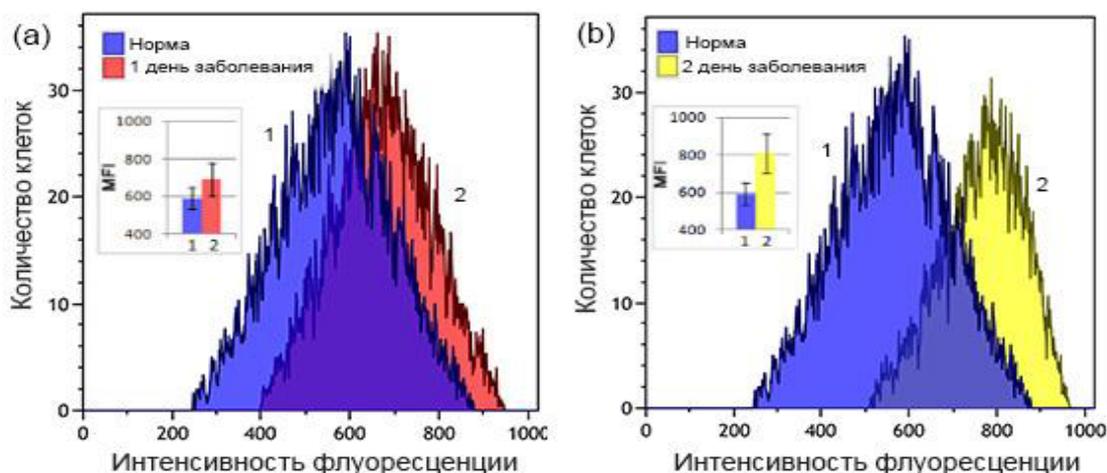


Рисунок 2 – Динамика распределения интенсивности РРВ нейтрофилов у доноров с ОРВИ в первые 2 дня заболевания

(а) Гистограмма распределения флуоресценции для 1 – нормального состояния, 2 – 1-го дня заболевания;
 (б) Гистограмма распределения флуоресценции на 2-й день заболевания

При возникновении бактериальных осложнений наблюдалось снижение способности нейтрофилов к РРВ вместо возврата к норме (рис. 1(1)).

Для дальнейшего изучения наблюдаемого эффекта измеряли функциональную активность нейтрофилов здоровых доноров после вакцинации против гриппа. Основываясь на результатах описанных выше экспериментов, измерения были проведены в день вакцинации и через 48 часов после нее. Исследование показало, что инактивированная вакцина против гриппа (ИГВ) не влияла на функциональную активность нейтрофилов (рис. 3а). Между тем, треть доноров, вакцинированных “живой” вакциной против гриппа (ЖГВ), продемонстрировали изменения интенсивности РРВ нейтрофилов, аналогичные эксперименту с пациентами с ОРВИ (рис. 1,2) (увеличение интенсивности РРВ в первые 48 часов после вакцинации) (рис. 3б). Следует отметить, что при оценке влияния вакцинации на способность нейтрофилов продуцировать АФК были проведены стандартные тесты ИФА для определения содержания С-реактивного белка в образцах. Концентрация С-реактивного белка во всех образцах соответствовала норме (5,0 г/л ($\pm 0,05$ г/л) при верхней границе нормы 6,0 г/л).

Кроме того, мы проанализировали 42 образца крови, взятых у доноров, которые прошли исследование на наличие антител (IgA, IgM, IgG) к SARS-CoV-2 (рис.4(а)).

Из 13 образцов крови, которые характеризовались высоким уровнем IgA (соотношение $>0,8$) и низким уровнем IgG (соотношение $<0,3$), у 9 (69,2%) наблюдалось увеличение интенсивности РРВ на 10-15% (рис. 5) (3 образца также показали наличие IgM к SARS-CoV-2). Еще один пациент из этой группы (7,7%)

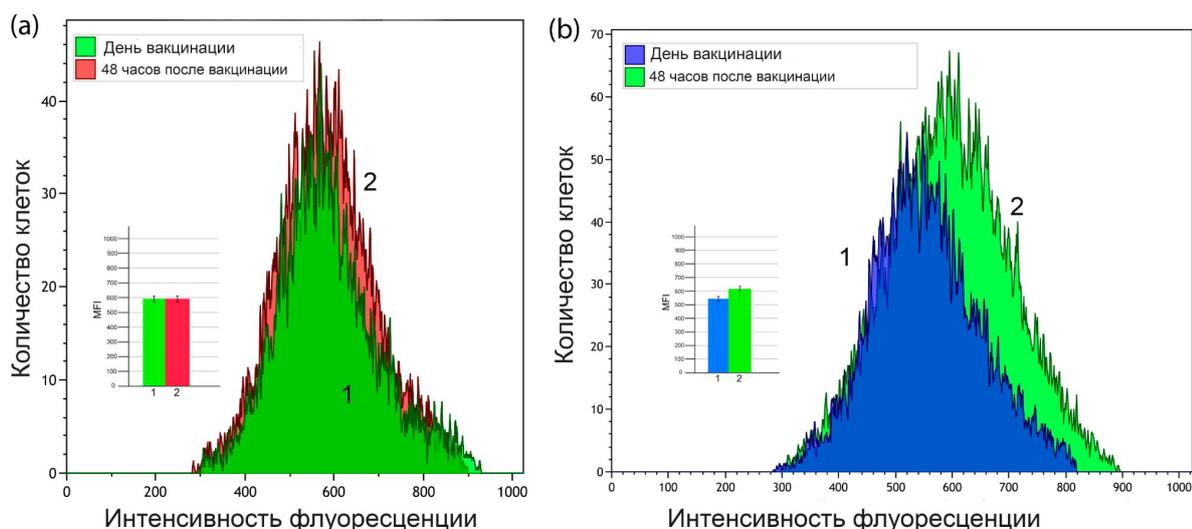


Рисунок 3 – Оценка способности нейтрофилов к реакции респираторного взрыва в день вакцинации и через 48 часов

(а) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ после вакцинации инактивированной вакциной “Ультрикс”;
 (б) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ после вакцинации “живой” вакциной ЖГВ

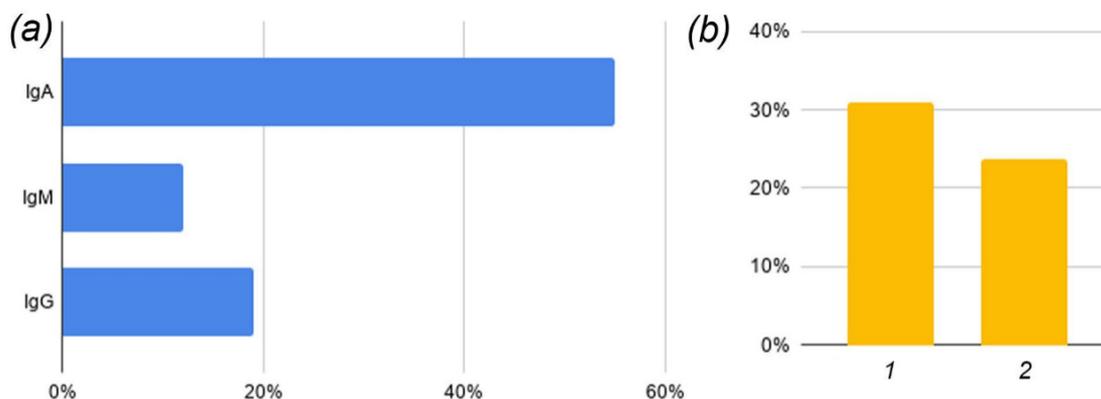


Рисунок 4 – Серологические тесты на антитела к SARS-CoV-2 (обследовано 42 пациента)
 (a) Процент пациентов, у которых были выявлены высокие уровни IgA, IgM и IgG;
 (b) Процент пациентов, у которых наблюдался: 1 – высокий уровень IgA и низкий уровень IgG, 2 – увеличение интенсивности PPV на 8-15%

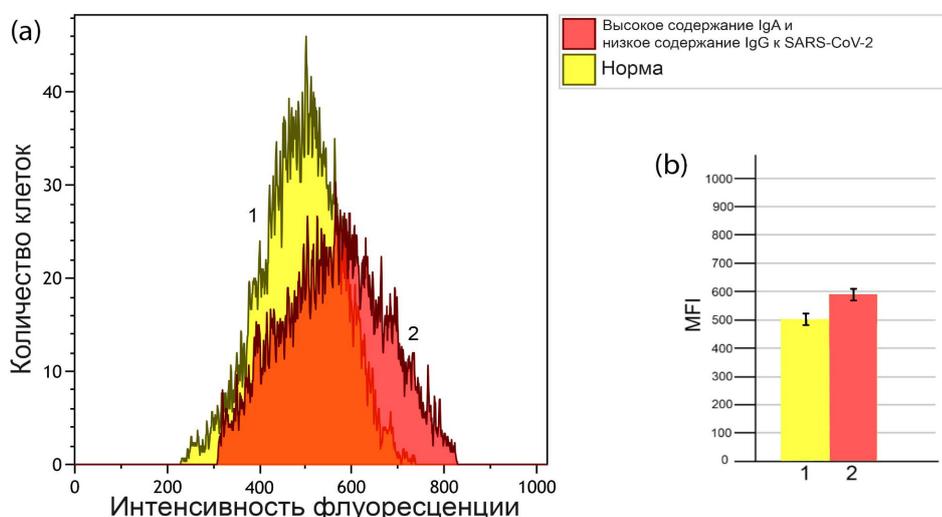


Рисунок 5 – Распределение способности нейтрофилов к реакции респираторного взрыва в образцах с высоким уровнем IgA и низким уровнем IgG (анти-SARS-CoV-2) у пациентов с подозрением на Covid-19
 (a) Распределение способности нейтрофилов к PPV в образцах с высоким уровнем IgA и низким уровнем IgG – красное, нормальное распределение – желтое;
 (b) Среднее значение интенсивности PPV у здоровых доноров и у пациентов с подозрением на Covid-19: 1 – распределение у здоровых доноров; 2 – распределение у пациентов с высоким уровнем IgA и низким уровнем IgG

продемонстрировал увеличение интенсивности PPV на 8%. Образцы крови, характеризующиеся другими комбинациями концентраций антител, показали нормальную способность нейтрофилов к PPV. Таким образом, в 23,8% проанализированных образцов крови выявлено увеличение интенсивности PPV на 8-15%, и в крови этих пациентов наблюдался высокий уровень IgA и низкий уровень IgG к SARS-CoV-2 (рис. 4(б)).

Чтобы определить, является ли праймирующий агент элементом плазмы крови, полученную от здорового донора плазму добавляли к образцам крови, собранным в 1-й день ОРВИ. В результате распределение интенсивности PPV вернулось к нормальному (рис. 6).

Основываясь на временных изменениях концентраций белков острой фазы воспаления (БОФ), мы предположили, что фибриноген может участвовать в изменениях интенсивности PPV. Добавление фибриногена в образцы крови в концентрациях, характерных для воспалительного процесса, привело к распределению интенсивности флуоресценции, соответствующему праймированным нейтрофилам (рис. 7).

ДИСКУССИЯ

В последнее время роль нейтрофилов в противовирусной реакции организма привлекает все больше внимания. Результаты, представленные в этой статье, подтверждают участие механизмов окислительного

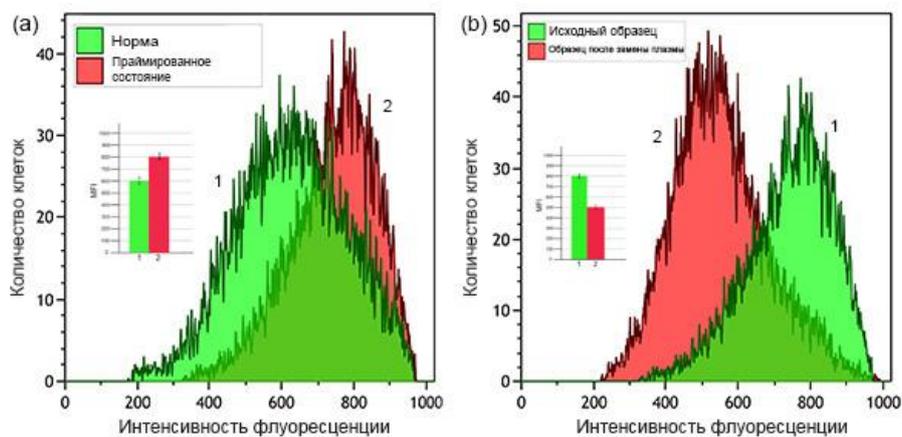


Рисунок 6 – Оценка способности плазмы крови к праймированию нейтрофилов

(a) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ в крови с исходной плазмой: 1 – нормальное состояние, 2 – исходное состояние;

(b) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ в крови с замещенной плазмой: 1 – исходная кровь, 2 – кровь с замещенной плазмой

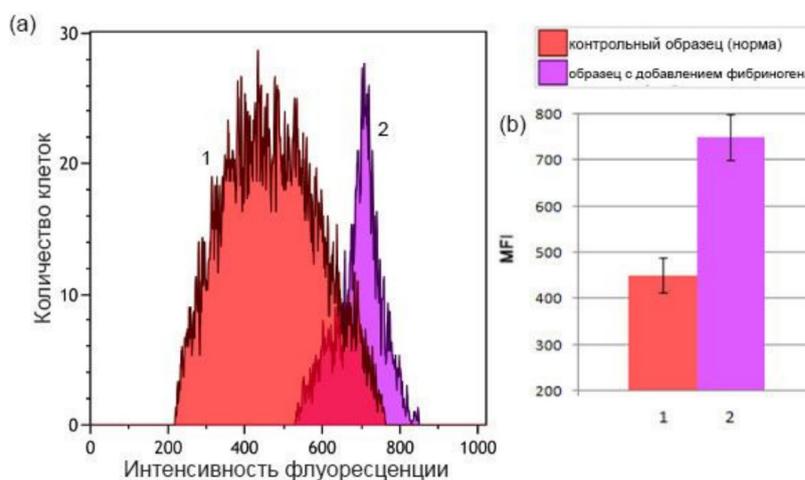


Рисунок 7 – Распределение способности нейтрофилов к реакции респираторного взрыва с добавлением фибриногена

(a) Гистограмма распределения способности нейтрофилов к РРВ для: 1 – нормы, 2 – образцов с добавлением фибриногена;

(b) Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для: 1 – нормы, 2 – образцов с добавлением фибриногена

стресса, связанных с врожденным иммунитетом, в раннем противовирусном ответе и дополняют эту область знаний.

Перепроизводство АФК и дефекты антиоксидантной системы играют значительную роль в патогенезе ОРВИ, а также в прогрессировании и тяжести сопутствующих респираторных заболеваний [30]. Наши результаты демонстрируют влияние вирусной инфекции на интенсивность РРВ. Как показано на рисунках 1 и 2, на первых стадиях развития заболевания наблюдается повышение уровня генерации АФК в нейтрофилах периферической крови. Такое перепроизводство АФК может привести к необратимому повреждению органов легочной, сердечно-сосудистой и почечной систем. Стоит отметить, что именно эти три системы органов наиболее подвержены тяжелому течению Covid-19, вызванному новым вирусом SARS-CoV-2 [31,32,33].

Известно, что функциональная активность нейтрофилов периферической крови и интенсивность РРВ модулируются *in vivo* некоторыми белками провоспалительной и острой фазы [13,26,29,34]. При вирусных инфекциях и острых воспалениях нейтрофилы, мигрирующие к месту повреждения тканей, переходят в праймированное состояние, и их способность к РРВ возрастает [13,28,29,34]. С другой стороны, снижение интенсивности РРВ во время беременности обусловлено наличием в крови белка острой фазы церулоплазмينا [29].

В настоящем исследовании показано, что при добавлении плазмы здорового донора к плазме пациента, инфицированного вирусом, способность нейтрофилов генерировать АФК возвращается к норме (рис.6). Эти результаты подтверждают наличие агента/агентов в плазме крови, стимулирующих нейтрофилы во время вирусной инфекции. Белок фибриноген острой фазы воспаления оказался одним из компонентов крови, существенно влияющих на интенсивность РРВ. Добавление фибриногена в концентрациях, характерных для

воспалительного процесса при ОРВИ, вызывает повышение способности нейтрофилов генерировать АФК. В этом случае интенсивность РРВ совпадает с интенсивностью РРВ праймированных нейтрофилов периферической крови при ОРВИ (рис. 7).

В этом исследовании была проведена оценка функциональной активности нейтрофилов, взятых у пациентов с бессимптомными или легкими заболеваниями, вызванными новым коронавирусом SARS-CoV-2. Анализ РРВ таких пациентов выявил корреляцию способности нейтрофилов генерировать АФК от титра антител к SARS-CoV-2 (рис. 4).

Кинетика для IgA, IgM и IgG хорошо изучена на большом количестве серологических тестов [30,35-37].

Из 42 обследованных нами пациентов с подозрением на Covid-19 почти у четверти (24%) наблюдалось увеличение интенсивности РРВ на 8-15% относительно нормы (рис. 5), и эти пациенты продемонстрировали высокое содержание IgA и низкое содержание IgG. Принимая во внимание существующие данные о кинетике антител, представляется, что мы имеем дело с началом поздней фазы заболевания (примерно через 2-3 недели после появления первых симптомов) (рис. 4), вызванной вирусной инфекцией, и легкой формой Covid-19 (без бактериальных осложнений и острой воспалительной реакции). Вероятно, в случае инфекции SARS-CoV-2, даже если заболевание протекает бессимптомно, окислительный стресс отличается от реакций нейтрофилов при других респираторных вирусных инфекциях. Таким образом, мы наблюдаем увеличение интенсивности РРВ относительно нормы даже по прошествии достаточно большого периода с момента начала инфекции. Однако эта гипотеза требует дальнейших исследований.

Повышенная концентрация фибриногена, характерная для пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, также может способствовать повышению функциональной активности нейтрофилов [38,39]. Увеличение интенсивности РРВ в ответ на стимуляцию фибриногеном (рис. 7) является косвенным подтверждением этого предположения.

Другой представленный результат связан с анализом реакции нейтрофилов у здоровых людей на вакцинацию инактивированными или “живыми” противогриппозными вакцинами. Различие в их влиянии на функциональную активность нейтрофилов следует учитывать при вакцинации людей с иммунной дисфункцией вследствие различных заболеваний.

Подводя итог, можно сказать, что результаты нашего исследования не только позволяют лучше понять механизмы влияния вирусов на функциональную активность нейтрофилов, но и расширяют поле деятельности при изучении противовирусного ответа врожденного иммунитета.

Работа поддержана Благотворительным Фондом им. В.Н. Фомичева.

Список литературы / References:

1. Schonrich G., Raftery M.J. Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. *Front. Immunol.*, 2016, vol. 7, p. 366.
2. Nordenfelt P., Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, vol. 90, pp. 271-284.
3. Soehnlein O. Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J. Mol. Med.*, 2009, vol. 87, pp. 1157-1164.
4. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, vol. 6, pp. 173-182.
5. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 11, pp. 519-531.
6. Essin K.M., Gollasch M., Rolle S., Weissgerber P., Sausbier M., Bohn E. et al. BK channels in innate immune functions of neutrophils and macrophages. *Blood*, 2009, vol. 113, pp. 1326-1331.
7. Yipp B.G., Petri B., Salina D., Jenne C.N., Scott B.N.V., Zbytnuik L.D. et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.*, 2012, vol. 18, pp. 1386-1393.
8. Tillack K., Breiden P., Martin R., Sospedra M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.*, 2012, vol. 188, pp. 3150-3159.
9. Jenne C.N., Wong C.H.Y., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*, 2013, vol. 13, pp. 169-180.
10. Hiroki C.H., Toller J.E., Fumagalli M.J., Colon D.F., Figueireo L.T.M., Fonseca B. Neutrophil Extracellular Traps effectively control acute Chikungunya virus infection. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 10, p. 3108.
11. Muraro S.P., De Souza G.F., Gallo S.W., De Silva B.K. Respiratory Syncytial Virus induces the classical ROS-dependent NETosis through PAD-4 and necroptosis pathways activation. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, p. 14166.
12. Mozzini C., Girelli D. The role of neutrophil extracellular traps in Covid-19: only a hypothesis or a potential new field of research? *Thromb Res.*, 2020, vol. 191, pp. 26-27.
13. White M.R., Crouch E., Vesona J., Tacke P.J., Batenburg J.J., Leth-Larsen R. et al. Respiratory innate immune proteins differentially modulate the neutrophil respiratory burst response to influenza A virus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2005, vol. 289, pp. L606-L616.
14. Zhang Z., Rong L., Li Y.P. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. *Oxid Med Cell Longev*, 2019.
15. Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Ivanova O.N., Kotchetkov S.N., Starodubova E.S. et al. Oxidative Stress

during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid Med Cell Longev.*, 2016.

16. Ntyonga-Pono M.-P. COVID-19 infection and oxidative stress: an under-explored approach for prevention and treatment? *Pan Afr Med J.*, 2020, vol. 35, p. 12.

17. Khomich O.A., Kochetkov S.N., Bartosch B. Redox biology of respiratory viral infections. *Viruses*, 2018.

18. Imai Y., Kuba K., Neely G.G. Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. *Cell*, 2008, vol. 133, pp. 235-249.

19. Jorch S.K., Kubers P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.*, 2017, vol. 23, pp. 279-287.

20. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, vol. 18, pp. 134-147.

21. Hong C.W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw.*, 2017, vol. 17, pp. 298-306.

22. Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.*, 2018, vol. 9, p. 113.

23. Klemke M., Wabnitz G.H., Funke F., Funk B., Kirchgessner H., Samstag Y. Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity*, 2008, vol. 29, pp. 404-413.

24. Hock B.D., Taylor K.G., Cross N.B., Kettle A.J., Hampton M.B., McKenzie J.L. Effect of activated human polymorphonuclear leucocytes on T lymphocyte proliferation and viability. *Immunology*, 2012, vol. 137, pp. 249-258.

25. Filatov M., Varfolomeeva E., Ivanov E. Flow cytofluorometric detection of inflammatory processes by measuring respiratory burst reaction of peripheral blood neutrophils. *Biochem. Mol. Med.*, 1995, vol. 55, pp. 116-121.

26. Thomas G., Rogues B. Proton magnetic resonance studies of ethidium bromide and its sodium borohydride reduced derivative. *FEBS Lett.*, 1972, vol. 26, pp. 169-175.

27. Himmelfarb J., Hakim R.M., Holbrook D.G., LEEBER D.A., Ault K.A. Detection of granulocyte reactive oxygen species formation in whole blood using flow cytometry. *Cytometry*, 1992, vol. 13, pp. 83-89.

28. Varfolomeeva E.Yu., Ivanov E.I., Drobchenko E.A., Semenova E.V., Filatov M.V. Detection of inflammatory processes during various diseases by the method of flow cytofluorometry. *Bull Exp Biol Med.*, 2010, vol. 149, pp. 485-489.

29. Varfolomeeva E.Y., Semenova E.V., Sokolov A.V., Aplin K.D., Timofeeva K.E. et al. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. *Free Radic Res.*, 2016, vol. 50, pp. 909-919.

30. Delgado-Roche L., Mesta F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. *Arch Med Res.*, 2020, vol. 51, pp. 384-387.

31. Barnes B.J., Adrover J.M., Baxter-Stoltzfus A., Borczuk A., Cools-Lartigue J., Crawford J.M. et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.*, 2020.

32. Bonow R.O., Fonarow G.C., O'Gara P.T., Yancy C.W. Association of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With Myocardial Injury and Mortality. *JAMA Cardiol.*, 2020.

33. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, vol. 395, pp. 507-513.

34. Hartshorn K.L., Sastry K., Brown D., White M.R., Okarma T.B. et al. Conglutinin acts as an opsonin for influenza A viruses. *J Immunol.*, 1993a, vol. 151, pp. 1-9.

35. Jaaskelainen A.J., Kekalainen E., Kallio-Kokko H., Mannonen L., Kortela E., Vapalahti O. et al. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples. *Euro Surveill.*, 2020.

36. Padoan A., Sciacovelli L., Basso D., Negrini D., Zuin S., Cosma C. et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clin Chim Acta.*, 2020, vol. 507, pp. 164-166.

37. Haveri A., Smura T., Kuivanen S., Osterlund P., Hepojoki J., Ikonen N. et al. Serological and molecular findings during SARS-CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. *Euro Surveill.*, 2020.

38. Connors J.M., Levy J.H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*, 2020, vol. 135, pp. 2033-2040.

39. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.*, 2020, vol. 18, pp. 844-847.

**VIRAL INFECTIONS AFFECT THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD
NEUTROPHILS****Fedorova N.^{1,2}, Sumbatian D.¹, Stukova M.³, Ivanov A.⁴, Semenova E.¹, Filatov M.¹, Varfolomeeva E.^{1,2}**¹Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»,
188300, mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, Russia²National Research Center “Kurchatov Institute”

Akademika Kurchatova pl. 1, 123182, Moscow, Russian Federation

³Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health
197376, Prof. Popov str. 15/17, St. Petersburg, Russia⁴Saint-Petersburg State University Hospital
Fontanka river emb., 154, St.Petersburg, 198103, Russia

Abstract. Neutrophils are the primary cells of the innate immune system. They destroy pathogenic microorganisms carrying out the oxidative stress mechanism through phagocytosis and extracellular traps (NETs). The aim of the present work is the study of the influence of the viral infection on functional activity (respiratory burst reaction intensity) of peripheral blood neutrophils. The study was conducted on the whole human blood using the flow cytometry technique. The changes in respiratory burst reaction intensity during ARVI development and in case of bacterial complications appearance were analyzed. The blood plasma component priming neutrophils in viral infections was determined (acute phase protein fibrinogen). It was shown that healthy donors' neutrophils react differently to vaccination with inactivated and “alive” influenza vaccines. The fact that neutrophils' capacity to generate reactive oxygen species correlates with the titer of IgA and IgG antibodies to SARS-CoV-2 in patients with asymptomatic or mild Covid-19 was revealed. The obtained data confirm the influence of viral infections on the neutrophils' functional activity. Also, the protein that might be responsible for this influence was suggested.

Key words: *neutrophils, oxidative stress, respiratory viral infection, flow cytometry.*